

**Οδηγίες χρήσης BIOGNOST® Δοκιμασία Αντισώματος****CE**

Ανίχνευση αντισωμάτων κατά IgG, IgM, IgA σε ανθρώπινο ορό με Έμμεσο Ανοσοφθορισμό.

Χρόνος διαδικασίας 90-120 λεπτά.

**ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ**

Το Biognost® IFA είναι μια έμμεση δοκιμασία φθορισμού αντισώματος για την ποιοτική και / ή ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των αντισωμάτων σε ανθρώπινο ορό. Η Biognost® IFA προορίζεται για χρήση ως βοήθημα στη διάγνωση in vitro.

**ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ**

Το τεστ βασίζεται στην κλασική μέθοδο του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Το υπόστρωμα της πλάκας έχει επικαλυφθεί με αντιγόνο. Αρχικά το δείγμα του ασθενούς τοποθετείται στη πλάκα και επωάζεται. Εάν το δείγμα του ορού περιέχει οποιοδήποτε αντίσωμα στο αντίστοιχο αντιγόνο αυτό θα συνδέεται προς το αντιγόνο στόχο του στη διαφάνεια. Οι ανοσοσφαιρίνες χωρίς περιορισμούς και άλλα συστατικά του δείγματος απομακρύνονται στη συνέχεια από την έκπλυση της ολίσθησης με το παρεχόμενο ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης. Μην αναδεύετε κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πλύσιματος γιατί το ακινητοποιημένο υπόστρωμα μπορεί να καταστραφεί. Στο δεύτερο βήμα επώασης τα σχηματισμένα στο πρώτο στάδιο συμπλέγματα αντισώματος-αντιγόνου συνδέονται με τη φθοριόχρωμη αντι-ανθρώπινη σφαιρίνη (FITC-conjugate). Η ασύνδετη σφαιρίνη απομακρύνεται με δεύτερο πλύσιμο. Τα σύμπλοκα αντιγόνου / ανθρώπινου αντισώματος / συζυγούς που σχηματίζονται μπορούν να απεικονιστούν με μικροσκοπία φθορισμού σε μεγέθυνση 400 έως 500fold.

Εάν είναι επιθυμητή η ειδική ανίχνευση των IgM ή IgA αντισώματα, τα δείγματα κατεργάζονται πρώτα με ένα ειδικό απορροφητικό (Biosorb®) που αφαιρεί το IgG και τον ρευματοειδή παράγοντα πριν από την εφαρμογή αυτών των δειγμάτων στο slide αντιγόνο-πλάκα(ανατρέξτε στις παραγράφους δομοστοιχεία και υλικά για δοκιμή)

Εάν το δείγμα του ασθενή που διερευνάται δεν περιέχει αντισώματα προς το αντίστοιχο αντιγόνο, κανένα συγκεκριμένο συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος δε θα σχηματισθεί και συνεπώς δεν θα υπάρχει ειδικός φθορισμός για να φανεί στο μικροσκόπιο.

**ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ**

Η έμμεση τεχνική ανοσοφθορισμού χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των διαφορετικών αντισωμάτων σε δείγματα ασθενών. Επειδή η συγγένεια των αντισωμάτων για το υπο εξέταση αντιγόνο/α μπορεί να ποικίλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των ασθενών, τα αποτελέσματα των δοκιμών είναι δύσκολο να τυποποιηθούν σε απόλυτες τιμές και επιμέρους τίτλοι αντισωμάτων δεν αντικατοπτρίζουν απαραίτητα τη σοβαρότητα της νόσου που διερευνήθηκε. Από την άλλη, επειδή η τεχνική αυτή βασίζεται σε υπόστρωμα της πλάκας που παρουσιάζει την (θεωρητικά) βέλτιστη περιοχή του σχετικά αντιγόνα, η τεχνική έμμεσου ανοσοφθορισμού είναι ιδανική για τη διαλογή αντισωμάτων. Όπου είναι διαθέσιμοι οι θετικοί έλεγχοι με γνωστούς τίτλους αντισωμάτων τότε τα αποτελέσματα των δοκιμών μπορούν να αξιολογηθούν ημιοσοτικά. Ωστόσο, υπενθυμίζεται στους χρήστες ότι η αξιολόγηση της κλινικής εικόνας δεν θα πρέπει να βασίζεται μόνο σε αυτά τα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα πρέπει πάντα να ερμηνεύονται υπό το γενικό πλαίσιο των συναφών πληροφοριών (π.χ. κλινικά συμπτώματα και σημεία, το χρονοδιάγραμμα της συλλογής δειγμάτων, άλλα εργαστηριακά ευρήματα, κατασκευαστής-ειδικά χαρακτηριστικά των συστατικών του προσδιορισμού, in-house εύρος αναφοράς για την αντίστοιχη δοκιμή) και σε συνδυασμό με άλλα διαθέσιμα δεδομένα των ασθενών.

**ΑΝΤΙΑΡΑΣΤΗΡΙΑ BIOGNOST®**

Οι Biognost® δοκιμασίες είναι διαθέσιμες ως kit ή μεμονωμένα συστατικά:

Πλάκα με υπόστρωμα: επικαλυμμένα με το αντίστοιχο αντιγόνο.

Θετικός έλεγχος: σταθεροποιημένος ανθρώπινος ορός που περιέχει αντισώματα προς το αντίστοιχο αντιγόνο, έτοιμο για χρήση.

Αρνητικός μάρτυρας: σταθεροποιημένος ανθρώπινος ορός που δεν περιέχει αντισώματα (IgG, IgM, IgA) όπως προσδιορίζεται από την δοκιμασία ανοσοφθορισμού, έτοιμο προς χρήση.

Σύζευγμα: μονό ή πολυειδικού αντι-ανθρώπινου ανοσοσφαιρίνης, με ή χωρίς αντιχρωστική Evans blue, έτοιμα προς χρήση, τρόπος αραίωσης όπως αναγράφεται στην ετικέτα.

Ρυθμιστικό διάλυμα PBS: εύκολο διαλυτό μίγμα ξηρής σκόνης, προετοιμάζει 500 ml ή 1000 ml ρυθμιστικού διαλύματος, pH 7.5, που περιέχει χλωριούχο φωσφορικό + 150 mM νάτριο 10 mM νάτριο.

Λάδι (mounting medium), αποτύπωση πρότυπων, καλυπτρίδες, οδηγίες χρήσης.

**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΑΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ**

Κατάλληλα δοχεία για την παρασκευή σειριακών αραιώσεων των δειγμάτων.

Πιπέτες ακριβείας και ρύγχη πιπετών για τη διανομή 1-1000 μl

Αναδευτήρας Vortex

Έναν ογκομετρικό κύλινδρο των 500 ml ή 1000 ml για την παρασκευή ρυθμισμένου με φωσφορικό αλατούχου διαλύματος

Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό

Θάλαμος επώασης με κατάλληλη υγρασία

Θερμοκοιτίδα (37 ° C)

Γούρνες χρώση

Δοχείο διαλύματος πλύσης

Χρονόμετρο

Σκοτεινού πεδίου μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρα που επιτρέπουν διέγερση στα 450-490 nm και εκπομπή στα 560-590 nm ((για την καλύτερη ευαισθησία, το συμβάν διέγερσης θα πρέπει να χρησιμοποιείται κατά προτίμηση πάνω από διέγερση μετάδοσης). Μη χρησιμοποιείτε λάδι βουθού.

**ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ**

Αποθηκεύστε όλες τις πλάκες, τους ελέγχους, τις συζεύξεις και το Biosorb® στη θερμοκρασία που αναγράφεται στην ετικέτα. Για να αποτρέψετε από το στέγνωμα τις επικαλυμμένες διαφάνειες με αντιγόνο και τη μετουσίωση πρέπει να φυλάσσεται στην ερμητικά κλειστή πλαστικοποιημένη θήκη αλουμινίου που παρέχεται. Τα **μη ανοιγμένα** αντιδραστήρια είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα εάν οι συστάσεις ακολουθούνται αυστηρώς. Μην χρησιμοποιείτε κάποιο από αυτά τα αντιδραστήρια, αφού έχουν λήξει.

Μετά την πρώτη χρήση τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι καλά κλεισμένα και να αποθηκεύονται στη θερμοκρασία που αναγράφεται στην ετικέτα. Αυτά τα αντιδραστήρια πρέπει να καταναλώνονται το συντομότερο δυνατό.

Σταθερότητα στην επαναχρησιμοποίηση δεν σχετίζεται υποχρεωτικά με την ημερομηνία λήξης.

Το μείγμα σφραγισμένου αέρα ξηρής σκόνης του ορού ρυθμισμένου με φωσφορικά μπορούν να αποθηκεύονται επ'αόριστον σε θερμοκρασία δωματίου ή παρακάτω εάν δεν έχει ανοιχτεί.

Το υλικό σταθεροποίησης, τα πρότυπα κηλίδωσης και οι καλυπτρίδες μπορούν να αποθηκεύονται επ'αόριστον σε θερμοκρασία δωματίου. Στην ετικέτα του προϊόντος αναγράφεται η ημερομηνία λήξης. Δεν εξυπηρετεί κανένα άλλο σκοπό παρά να διευκολύνει τον έλεγχο των αποθεμάτων. Το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης PBS (pH 7,5) πρέπει να παρασκευάζεται την ημέρα της χρήσης, δεδομένου ότι δεν περιέχει συντηρητικά. Σε περίπτωση που υπάρχει κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα που απέμεινε και θέλετε να το χρησιμοποιήσετε την επόμενη ημέρα, θα πρέπει να φυλάσσονται σε κλειστά δοχεία στους 5-10 ° C. Απορρίψτε τυχόν ρυθμιστικό διάλυμα PBS εάν εμφανίζεται θολότητα, χρωματισμός ή κροκιδώδες ίζημα ή αν το pH έχει αλλάξει.

**ΜΕΤΡΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ**

1. Όλα τα kit και τα συστατικά δοκιμασίας που αναφέρονται στις οδηγίες χρήσης (βλέπε παράγραφο ΣΥΝΙΣΤΩΣΕΣ) είναι μόνο για in vitro διαγνωστική χρήση.
2. Όλοι οι ανθρώπινοι οροί που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των σκευασμάτων από ανθρώπινο ορό (μάρτυρες) που απαριθμούνται στα συστατικά τμήμα πρέπει να θεωρούνται δυνητικά μολυσματικά και να χειρίζονται με την κατάλληλη προσοχή.
3. Όλα τα υγρά αντιδραστήρια, όπως οι έλεγχοι, συζευγμένο κλπ περιέχουν 0,09% αζίδιο του νατρίου. Το αζίδιο του νατρίου είναι δηλητηριώδες. Να μην καταπίνετε και να αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή με το δέρμα και τις βλεννώδεις μεμβράνες. Το αζίδιο που περιέχεται στα αντιδραστήρια δεν πρέπει να έρχεται σε επαφή με οποιοδήποτε χαλκό ή μόλυβδο που περιέχουν αντικείμενα, για παράδειγμα ορισμένων σωλήνων αποχέτευσης, καθώς αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει στο σχηματισμό έκρηξης.
4. Όπως διευκρινίζεται στην ετικέτα του προϊόντος, μερικά από τα προϊόντα σύζευξης περιέχουν τη χρωστική Evans blue για αντιχρωματισμό. Evans blue είναι μια πιθανή καρκινογόνο ουσία (κατηγορίας 1 \* δηλητήριο σύμφωνα με την ελβετική πρόγραμμα δηλητήρια). Παρά το γεγονός ότι η συγκέντρωσή της χρωστικής είναι πολύ χαμηλή (μέγιστο 0,2 mg / ml), συνιστάται στους χρήστες να φροντίσουν να μην καταπίνουν αυτά τα συζυγή και να αποφεύγεται κάθε επαφή με το δέρμα.
5. Οι κανονισμοί ασφαλείας των εμπορικών ενώσεων και του αντίστοιχου Ινστιτούτου (εργαστήριο) θα πρέπει να τηρούνται αυστηρά (βλ ανακοινώσεις, εργαστηριακή κατευθυντήριες γραμμές, ασφάλεια οδηγίες κλπ).
6. Κανόνες Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής (κατευθυντήριες γραμμές ΟΕΠ).
7. Υλικά και αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στη δοκιμή πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις ισχύουσες νομοθετικές ρυθμίσεις και ο χώρος εργασίας πρέπει να απολυμαίνεται.

**ΥΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ**

Ορός και πλάσμα είναι και τα δύο κατάλληλα για δοκιμή. Τα δείγματα ορού και πλάσματος είναι σταθερά για περίπου 1 εβδομάδα εφόσον διατηρείται στους 5-10 ° C. Αν για την αποθήκευση ή τις επαναλαμβανόμενες δοκιμές των δειγμάτων απαιτούνται μεγαλύτερες χρονικές περιόδους, τα δείγματα θα πρέπει να υποδιαφραθούν σε μικρά τμήματα (50 µl), άμεση κατάψυξη σε υγρό άζωτο και να αποθηκεύονται στους ή κάτω από τους -20 ° C. Μεγαλύτεροι όγκοι του ορού ή του πλάσματος δεν πρέπει να εκτίθενται σε επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης-απόψυξης, επειδή αυτό μπορεί να προκαλέσει συσσωμάτωση των πρωτεϊνών και υποβάθμιση κάποιων συστατικών του ορού και του πλάσματος. Επειδή το αζίδιο δεν παρεμβαίνει με τα δείγματα δοκιμασίας, ο ορός και το πλάσμα μπορούν επίσης να σταθεροποιηθούν με 0.09% αζίδιο. Τέτοια δείγματα μπορεί να φυλάσσονται για παρατεταμένες περιόδους (μέχρι και 1 έτος) στους 5-10 ° C.

Ωστόσο, εάν τα δείγματα ορού πρέπει να δοκιμάζονται για IgA ή IgM αντισώματα, αυτά θα πρέπει πρώτα να είναι καταλλήλως σε προεπεξεργασία για την αποφυγή τυχόν ψευδώς θετικών αντιδράσεων λόγω ρευματοειδούς παράγοντες σε συνδυασμό με αντισώματα IgG και να εμποδίζουν κάθε δυνητικό ανταγωνισμό για τις περιοχές δέσμευσης αντιγόνου από IgG η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Ένα έτοιμο προς χρήση σύστημα διαχωρισμού που διατίθενται από τη Bios® μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό (Biosorb®, να παραπέμπουν σε συστήματα τμημάτων διαχωρισμού). Παρά το γεγονός ότι είναι ειδικά βελτιστοποιημένη για διαχωρισμό IgG / IgM, αυτό το σύστημα είναι επίσης κατάλληλο για την προεπεξεργασία των δειγμάτων σε ποσοτικούς προσδιορισμούς IgA. Αφαιρεί περίσσεια IgG από το δείγμα, ενώ και οι δύο IgM και τα περισσότερα από τα IgA παραμένουν. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας τα δείγματα θα γίνουν αραιά. Ο συντελεστής αραίωσης που προκύπτει για IgM και IgA είναι 1: 5 και πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την προετοιμασία του τελικού δείγματος αραίωσης για δοκιμή.

**ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΩΝ**

Για κάθε θετικό μάρτυρα θα πρέπει να περιλαμβάνεται αντίστοιχα και ένας αρνητικός μάρτυρας σε κάθε τρέξιμο. Κάθε έλεγχος πρέπει να αποδείξει αναμενόμενες αντιδράσεις όπως αναγράφονται στην ετικέτα προκειμένου να επικυρωθεί το τεστ. Αν οι τιμές ελέγχου που λαμβάνονται δεν εμπίπτουν στο αναμενόμενο εύρος, η εξέταση είναι άκυρη και πρέπει να επαναληφθεί.

Ο τίτλος που λαμβάνεται για τους θετικούς μάρτυρες θα πρέπει να ταιριάζει με την τιμή ελέγχου που αναγράφεται στην ετικέτα κατά ± 1 με 2 βαθμίδες αραίωσης. Εάν δεν ταιριάζει ελέγξτε τα ακόλουθα:

Έχουν χρησιμοποιηθεί συστατικά στη δοκιμασία που δεν είχαν αρχικά παραχθεί από τη Bios® (π.χ. καλυπτρίδες λάδι κλπ από άλλο προμηθευτή), ήταν το Biognost® ρυθμιστικό προσφάτα προετοιμασμένο; Τυχόν λειτουργικές ελλείψεις όσον αφορά το μικροσκόπιο φθορισμού, όπως : εάν έχουν επαληφθεί με λάδι οι αντικειμενικοί φακοί, κακή οπτική προσαρμογή, αδύναμη πηγή φωτός; Έχουν οι Biognost® πλάκες και τα αντιδραστήρια Biognost® φυλαχθεί σωστά ή έχουν χρησιμοποιηθεί εξαρτήματα τα οποία είναι ήδη ληγμένα; Ήταν ο θάλαμος επώασης στην κατάλληλη υγρασία (κατά τη διάρκεια της εφαρμογής της επεξεργασίας πλακών δεν πρέπει να αφήνεται να στεγνώσουν τα βοηθία σε οποιοδήποτε στάδιο). Οι πλάκες έχουν επισιμανθεί με στυλό κλπ; Αφήστε τα αντιδραστήρια να έρθουν σε θερμότητα δωματίου με φυσικό τρόπο και όχι με τη θέρμανση αυτών.

Οποιοδήποτε μη-ειδική πρόσδεση του συζυγούς μπορούν να ταυτοποιηθούν με τη συμπερίληψη ενός κενού ρυθμιστικού στη δοκιμαστική λειτουργία, δηλαδή αλατόνερο ρυθμισμένο με φωσφορικό εφαρμόζεται αντί ενός δείγματος ασθενή σε ένα από τα βοηθία και υποβάλλονται σε επεξεργασία σύμφωνα με τη συνήθη διαδικασία δοκιμής.

Δοκιμασία ευαισθησίας και ειδικότητας παρακολουθούνται συνεχώς στο εργαστήριο ελέγχου της Bios® ώστε να εξασφαλιστεί η συνεπής απόδοση της δοκιμής. Η Bios® εφαρμόζει όλο τον ορό και τον έλεγχο που διατίθενται από την WHO ή άλλους επίσημους οργανισμούς τυποποίησης δοκιμασίας. Οι προβλεπόμενοι Biognost® θετικοί και αρνητικοί μαρτύρων βαθμονομούνται σύμφωνα με πρότυπα οι ορούς από ασθενείς που χαρακτηρίζονται κλινικά οι διαθέσιμους αιμοδότες.

Η Εγγύηση από τη Bios παρατείνεται μόνο εάν οδηγίες χρήσης ακολουθούνται αυστηρά, εάν τα αποκλειστικά προϊόντα της Bios που εφαρμόζονται στο τεστ είναι επικυρωμένα και αν η λειτουργία του πραγματοποιείται με εξειδικευμένο προσωπικό.

**ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΟΚΙΜΗΣ**

Εάν το προϊόν σύζευξης παρέχεται ως συμπύκνωμα, πριν από την εξέταση, θα πρέπει να αραιωθεί με το ρυθμιστικό PBS, όπως αναφέρεται στην ετικέτα. Το σύζευγμα δεν είναι σταθερό εάν έχει μόλις αραιωθεί. Θα πρέπει να παρασκευάζονται για κάθε δοκιμή.

**ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ**

Πριν από την έναρξη της δοκιμασίας, αφήστε τις πλάκες Biognost®, τους ελέγχους και τα συζυγή να πάρουν την θερμοκρασία δωματίου. Αυτό διαρκεί περίπου 5 λεπτά. Οι έλεγχοι και τα συζυγή τυποποιούνται έτοιμα για χρήση και ως εκ τούτου δεν απαιτούν περαιτέρω αραίωση για τον προσδιορισμό.

Για οδηγίες σχετικά με τη χρήση των Biosorb® ως IgM (/ IgA IgG) σύστημα διαχωρισμού ακολουθήστε την τελική αραίωση του δείγματος, παρακαλούμε ανατρέξτε στην ενότητα Συστατικά και τις οδηγίες χρήσης Cat.No. S0001tie.

Οι μάρτυρες Biognost® έχουν ήδη υποστεί προεπεξεργασία εάν είναι απαραίτητο και κατά συνέπεια δεν θα πρέπει να υποβληθεί σε οποιαδήποτε περαιτέρω ανοσοσφαιρική κατηγορίας διαχωρισμού ή απορροφήσεις.

Το αντιγόνο για όλες τις πλάκες Biognost® έχει ήδη καθοριστεί. Τα υποστρώματα μπορούν να καταστραφούν από ένα δεύτερο στάδιο στερέωσης στο εργαστήριο του πελάτη.

Πριν από τη δοκιμή, τα δείγματα ορού πρέπει να είναι κατάλληλα (δοκιμών διαλογής ή ογκομετρήσεις) αραιωμένα με αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, είτε με ή χωρίς 1% αλβουμίνη βόειου ορού. Κοινές σειρές αραίωσης: 1: 2, 1: 4, 1: 8 κλπ ή 1: 5, 1: 10, 1: 20 κ.λπ.

Πριν από την έναρξη της ανάλυσης, τη διανομή και το σχέδιο αναγνώρισης για όλα τα δείγματα και τους μάρτυρες που πρόκειται να υποβληθούν σε δοκιμή πρέπει να καθοριστούν προσεκτικά σε μια φόρμα. Αυτή η μορφή είναι η βάση για την ερμηνεία και την τεκμηρίωση των αποτελεσμάτων.

1. Ανοίξτε τον πλαστικοποιημένο φύλλο αλουμινίου στη διάτρητη εγκοπή και αφαιρέστε προσεκτικά τη διαφάνεια. Προσέξτε να μην αγγίξετε τα σημεία εφαρμογής. Αν οι πλάκες πρέπει να επισιμανθούν, αυτό γίνεται καλύτερα με ένα μολύβι. Ποτέ μη χρησιμοποιείτε μαρκαδόρους για το γράνιμο στις πλάκες σας.
2. Εφαρμόστε επαρκή όγκο των ελέγχων ή κατάλληλα αραιωμένο ορό του ασθενούς για να καλύψει εντελώς το σημείο εφαρμογής (μεταξύ 15 και 50 µl, ανάλογα με το μέγεθος των επιλεγμένων πλακών).
3. Επωάστε τις πλάκες στο θάλαμο επώασης με κατάλληλη υγρασία σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

**Εξάιρεση:** οι ιοί και ενδοκυτταρικά μικρόβια:

Ανίχνευση IgG: Επώαστε 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο θάλαμο επώασης με κατάλληλη υγρασία.

Ανίχνευση IgM / IgA: Επώαστε 30 λεπτά στους 37 ° C ή 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο θάλαμο επώασης με κατάλληλη υγρασία.

Προστατέψτε τις πλάκες από το άμεσο ηλιακό φως, κρατήστε μακριά από θερμαντικά σώματα.

4. Αφαιρέστε τις πλάκες από τον θάλαμο, απομακρύνετε την περίσσεια του υγρού και ξεπλύνετε προσεκτικά τις πλάκες με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα. (Μην στοχεύεται η ροή ρυθμιστικού απευθείας πάνω περιοχές εφαρμογής)

5. Βυθίστε τις πλάκες δυο φορές απο 5 λεπτά σε ένα μπανάκι με διάλυμα (PBS) αφού αλλάξετε το διάλυμα κάθε φορά.Μην αναδεύετε τις πλάκες στο μπανάκι.

6. Σκουπίζουμε με χαρτί το πλακάκι προσέχοντας να μη στεγνώσουν τα βοηθία κ προχωράμε άμεσα στο βήμα 7.

7. Μοιράστε την απαραίτητη ποσότητα ώστε να καλύψει το πηγαδάκι σφαιρίνη (conjugate) (15 έως 50 μl ανάλογα το μέγεθος) .Μια σταγόνα σφαιρίνης Biognost® είναι ~ 25 μl

8. Επώαστε τις πλάκες για 30 λεπτά θερμοκρασία χώρου στο θάλαμο επώασης με κατάλληλη υγρασία . Προστατέψτε διαφάνειες από το φως και να τις κρατήσετε μακριά από θερμαντικά σώματα.

9. Επαναλάβετε τα βήματα 4-6 και αμέσως να προχωρήσετε με το βήμα 10.

10. Εφαρμόστε τις καλυπτρίδες τοποθετώντας 2-3 σταγόνες μέσου σταθεροποίησης σε κάθε πλάκα και για την αποφυγή φυσαλλιδών τοποθετήστε προσεκτικά την καλυπτρίδα από το ένα άκρο προς το άλλο. Αξιολογήστε τις διαφάνειες με μικροσκόπιο φθορισμού. Για καλύτερα αποτελέσματα αυτό θα πρέπει να γίνει αμέσως. Το επιπλέον υλικό σκουπίζεται με χαρτοπετσέτα για να εμποδίσετε τις πλάκες από το να κολλήσουν με την πλατφόρμα παρουσίασης του μικροσκοπίου ή με τη βάση του κουτιού αποθήκευσης διαφανειών.

Για τη μακροπρόθεσμη διατήρηση, τα τοποθετημένα καλύμματα μπορεί να σφραγίζονται γύρω από τις άκρες με λίγες σταγόνες βερνίκι νυχιών. Η αποθήκευση κάτω των -20°C θα διατηρήσει τη πλάκα για χρόνια.

Αυτή η δοκιμασία μπορεί επίσης να υποβληθεί σε επεξεργασία με αυτοματισμό.

#### ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΙΑΦΑΝΕΙΩΝ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι διαφάνειες εξετάζονται σε 400 έως 500fold μεγέθυνση κάτω από ένα μικροσκόπιο φθορισμού σκοτεινού πεδίου (επισκόπηση σε 100fold μεγέθυνση). Για να αποφύγετε την απώλεια της ευαισθησίας από φωτολευκανση, μην σταθείτε στο ίδιο οπτικό πεδίο περισσότερο από όσο πραγματικά είναι απαραίτητο για την αξιολόγηση. Για καλύτερα αποτελέσματα θα πρέπει να εξεταστούν όσο περισσότερα βοηθία είναι εφικτά σε σύντομες συνεδρίες.

Μια δοκιμαστική λειτουργία μπορεί να θεωρηθεί επιτυχής μόνο αν οι έλεγχοι που περιλαμβάνονται στην πορεία καταδεικνύουν τα αναμενόμενα αποτελέσματα.

Συμβουλευτείτε τις οδηγίες πλήρους μήκους για χρήση και για λεπτομερές πληροφορίες σχετικά με την αξιολόγηση και την ερμηνεία των διαφόρων δοκιμασιών.

Παρακαλώ σημειώστε, ότι το IgM φθορισμού είναι λιγότερο λαμπρό από ότι του φθορισμού IgG. Επίσης τα μοτίβα φθορισμού IgM είναι διαφορετικά από τα πρότυπα IgG και επιπλέον μπορεί να διαφοροποιούνται από ορό σε ορό. Οι τίτλοι που δίνονται για τους ελέγχους μιας IgM δεν μπορούν να αναπαραχθούν σε κάθε παρτίδα από slide υποστρώματος. Αλλά ο αδιάλυτο θετικός μάρτυρας θα πρέπει να δίνει πάντα το θετικό αποτέλεσμα. Η πιθανή απόκλιση  $\pm 2$  βήματα του τίτλου δεν μπορεί να αποφευχθεί με τη μεθοδολογία IFA (ανατρέξτε στην ενότητα «Ποιοτικός έλεγχος και επίλυση προβλημάτων»).

Και για αυτή την απόκλιση θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

#### Πρότυπα χρώσης ανοσοφθορισμού:

Για την αξιολόγηση της δοκιμασίας, τα πρότυπα φθορισμού των δομών των ιστών ή των αντίστοιχων παθογόνων παραγόντων πρέπει να προσδιορίζονται.

##### Θετικός:

Ο ειδικός φθορισμός δείχνει ένα χαρακτηριστικό ανοικτού πράσινου χρωματισμό και η ένταση της είναι συνήθως σε μια κλίμακα από 1+ (ασθενής), μέσω 2+ (ενδιάμεσο), 3+ (φωτεινά) προς 4+ (πολύ φωτεινό).

##### Αρνητικός:

Μια βαθμολογία φθορισμού μικρότερη από 1+ θεωρείται αρνητικό αποτέλεσμα. Κάθε κτηρινωπή η σκουροπράσινη απόχρωση δεν είναι ειδική και αγνοείται.

##### Τίτλος:

Ο τίτλος αναφέρεται στην υψηλότερη αραιώση όπου εμφανίζεται φθορισμός 1+.Π.χ. σε αραιώση 1:80 με φθορισμό 1+ και στην αραιώση 1:160 αρνητική τότε αναφέρεται σαν τίτλος 80.

#### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

1. Weller T.H., Coons A.H.: Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varizella and Herpes Zoster Propagated in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86, 1954, 789-794
2. Riggs J.L., Siewald R.J., Burckhalter J.H., Downs C.M., Metcalf T.G.: Isothiocyanate Compounds as Fluorescent Labeling Agents for Immune Serum. Am. J. Pathol. 34, 1958, 1081-1097